



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>A61K 9/16, 9/51</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/30618</b> (43) Date de publication internationale: 2 juin 2000 (02.06.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02859</p> <p>(22) Date de dépôt international: 19 novembre 1999 (19.11.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/14863 20 novembre 1998 (20.11.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; 33, avenue du Docteur Georges Lévy, Parc-Club du Moulin à Vent, F-69603 Cedex Venissieux (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): HUILLE, Sylvain [FR/FR]; 3, rue Villon, F-69003 Lyon (FR). NICOLAS, Florence [FR/FR]; Résidence des Cèdres, 7, rue Maurice Genevoix, F-69740 Genas (FR). BRYSON, Nathan [US/FR]; 120, rue du Coteau, F-69390 Millery (FR). SOULA, Gérard [FR/FR]; 33, rue Nungesser, F-69330 Meyzieu (FR).</p> <p>(74) Mandataire: FLEURANCE, Raphaël; Cabinet Plasseraud, Le Danica B, 21, avenue Georges Pompidou, F-69486 Cedex 03 Lyon (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: PARTICLES BASED ON POLYAMINO-ACID(S) AND METHODS FOR PREPARING SAME</p> <p>(54) Titre: PARTICULES A BASE DE POLYAMINOACIDE(S) ET LEURS PROCEDES DE FABRICATION</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns delivery particles (DP's) for active principles (AP's) based on linear amphiphilic polyamino-acids (PAA's), with <math>\alpha</math>-peptide chains, capable of being spontaneously formed by contacting PAA's with a liquid medium, preferably with water, wherein the hydrophile part of the PAA's is solubilized more than the hydrophobic parts of said PAA's, such that the latter precipitate while being organised in discrete supra-molecular arrangements, of average size ranging between 0.01 and 20 <math>\mu</math>m, capable of combining with at least an AP and releasing the latter in vivo, in prolonged and controlled manner. The inventive suspension is characterised in that the recurrent amino acids (rAA's) constituting the main chain of PAA's are identical to or different from one another and are glutamic acid and/or aspartic acid and/or their salts; and some of said rAA's bear at least one hydrophobic group, said hydrophobic group, being identical to or different from one another. The invention is useful as carriers for active principles, in particular pharmaceutical, insulin or for therapeutic uses.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention concerne des particules de vectorisation (PV) de principes actifs (PA) du type de celles à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements <math>\alpha</math>-peptidiques; aptes à se former spontanément par mise en contact des PAA avec un milieu liquide, de préférence avec de l'eau, dans lequel la partie hydrophile des PAA se solubilise plus que la partie hydrophobe desdits PAA, de manière que ces derniers précipitent en s'organisant en arrangements supra-moléculaires discrets; de taille moyenne comprise entre 0,01 et 20 <math>\mu</math>m; et aptes à s'associer avec au moins un PA et à relarguer celui-ci in vivo, de manière prolongée et contrôlée. La suspension selon l'invention est caractérisée en ce que les aminoacides récurrents (AAR) constitutifs de la chaîne principale des PAA sont identiques ou différents entre eux et sont l'acide glutamique et/ou l'acide aspartique et/ou leurs sels; et en ce que certains de ces AAR sont porteurs chacun d'au moins un groupement hydrophobe, ces groupements hydrophobes étant identiques ou différents entre eux. Application à la vectorisation de principes actifs, notamment pharmaceutiques, l'insuline, à des fins thérapeutiques.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## PARTICULES A BASE DE POLYAMINOACIDE(S) ET LEURS PROCEDES DE FABRICATION

Le domaine de la présente invention est celui des Particules de Vectorisation (PV), utiles pour l'administration de principes actifs (PA). Ces derniers sont, de préférence, des médicaments ou des nutriments pour l'administration à un organisme animal ou humain par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale, parentérale, etc.. Mais il peut s'agir aussi de produits phytosanitaires, tels que des herbicides, des pesticides, des insecticides, des fongicides, etc. En terme de nature chimique, les PA plus particulièrement, mais non limitativement, concernés par l'invention sont, par exemple, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides et des polynucléotides.

La présente invention concerne, plus précisément, des Particules de Vectorisation, avantageusement de type submicronique, à base de polyaminoacides (PAA). La présente invention vise aussi bien les particules nues en tant que telles, que les systèmes de vecteurs de PA, constitués par les particules chargées par le (ou les) PA considéré(s). La présente invention a également trait à des suspensions colloïdales aqueuses comprenant ces PV.

L'invention concerne, également, des procédés de préparation desdites particules et suspensions colloïdales, avec et sans PA.

L'encapsulation de PA dans des PV a notamment, pour but d'augmenter la biodisponibilité desdits PA. De nombreuses techniques d'encapsulation ont déjà été proposées. De telles techniques visent, d'une part, à permettre le transport du PA jusqu'à son site d'action thérapeutique, tout en le protégeant contre les agressions de l'organisme (hydrolyse, digestion enzymatique, etc.) et, d'autre part, à contrôler la libération du PA sur son site d'action, afin de maintenir la quantité disponible pour l'organisme au niveau désiré. Les PA concernés par ces avatars de transport et de séjour dans l'organisme sont, par exemple, des protéines mais peuvent être, également, des produits tout autres, d'origine synthétique ou naturelle. La revue de M. J. HUMPHREY (Delivery System for peptide Drugs, éditée par S. DAVIS et L. ILLUM, Plenum Press, N. Y., 1986), fait état de la problématique concernant l'amélioration de la biodisponibilité des PA et l'intérêt des systèmes de vectorisation et de libération contrôlée.

Parmi tous les matériaux envisageables pour former des PV, les polymères sont de plus en plus utilisés, du fait de leurs propriétés intrinsèques. S'agissant du cahier des charges que l'on souhaite obtenir pour les PV, il est particulièrement exigeant et comprend, notamment, les spécifications suivantes.

- 1 - Il devrait, avantageusement, être possible d'obtenir une répartition granulométrique contrôlée, et adaptée au mode d'administration choisi et/ou au site thérapeutique visé.
- 2 - Il est souhaitable que les PV assurent la protection du PA jusqu'au site de libération.
- 3 - Les PV devraient, avantageusement, contrôler la vitesse de libération du PA.
- 4 - Il est préférable que le polymère, constituant les PV, soit biocompatible, éliminable (par excrétion), et/ou biodégradable et, encore mieux, qu'il soit métabolisé en produits non toxiques pour l'organisme.
- 5 - Il est également avantageux que le polymère, constitutif des PV, n'induisse pas de réponse immunitaire.
- 6 - Enfin, il est également souhaitable que les PV et les systèmes PV-PA puissent être obtenus par un procédé non dénaturant pour le PA.

Les propositions techniques antérieures, décrites infra, ont tenté de satisfaire à l'ensemble de ces spécifications. A titre d'illustration, on citera les propositions antérieures (a) à (h) : selon une première approche, qui comprend les propositions (a) à (d), l'inclusion du principe actif s'opère lors de la formation des supports de vectorisation; selon une seconde approche, citées dans les propositions (e) à (h), on produit des PV aptes, une fois fabriquées, à s'associer spontanément par absorption au PA.

- (a) Le brevet US-A-5 286 495 concerne un procédé d'encapsulation par vaporisation de protéines en phase aqueuse, à l'aide de matériaux ayant des charges opposées, à savoir : l'alginate (chargé négativement) et la polylysine (chargée positivement). Ce procédé de fabrication permet de produire des particules de taille supérieure à 35  $\mu\text{m}$ .
- (b) Par ailleurs, les techniques d'émulsion sont couramment utilisées pour préparer des microparticules chargées de PA. Par exemple, les demandes de brevets WO 91/06286, WO 91/06287 et WO 89/08449 divulguent de telles techniques d'émulsion dans lesquelles on a recours à des solvants organiques pour solubiliser des polymères, par exemple de type polylactique. Mais il s'est avéré que les solvants peuvent être dénaturants, notamment pour les PA peptidiques ou polypeptidiques.
- (c) On connaît, également, des PV biocompatibles, formées en solution aqueuse et appelées protéinoïdes, décrites dès 1970 par W. FOX et K. DOSE dans "Molecular Evolution and the origin of Life", Ed. Marcel DEKKER Inc. (1977). Ainsi, la demande de brevet WO 88/01 213 propose un système à base d'un mélange de polypeptides artificiels obtenus par condensation thermique d'acides

aminés. Les microparticules selon cette invention sont obtenues par un changement de pH qui provoque la précipitation des particules protéinoïdes.

- (d) On mentionnera également, pour mémoire, les brevets US 4 351 337 et 4 450 150 qui relèvent d'un domaine différent de celui de la vectorisation de PA propre à l'invention. Ces brevets divulguent des implants massiques fixés et localisés à des endroits bien précis de l'organisme. Les implants sont réalisés à partir de matériaux polymères du genre poly- $\alpha$ -aminoacide (Leu/GluOH et GluOEt/GluOH respectivement). Selon l'enseignement de ce brevet, les polyaminoacides préférés sont ceux riches en aminoacide hydrophobe (e. g. plus de 50 % de Leucine ou de Glu OEt) et insolubles dans l'eau. Le PA peut être incorporé dans une solution de poly- $\alpha$ -aminoacide dans un solvant organique. Cette solution est celle utilisée pour former l'implant par moulage/séchage (évaporation). Selon une autre variante, le PA peut être compris dans le noyau d'une microcapsule dont l'enveloppe est obtenue à partir d'une solution de copolymère et dont le diamètre est supérieur ou égal à 5 000  $\mu\text{m}$ . Le noyau peut être constitué de PA pur ou d'une matrice de copolymère incluant le PA et obtenue à partir de la solution de PAA dans un solvant organique.
- (e) La demande de brevet PCT WO/FR 97/02 810 divulgue une composition pour la libération contrôlée de principes actifs, comprenant une pluralité de particules lamellaires d'un polymère biodégradable, au moins en partie cristallin (polymère d'acide lactique) et d'un principe actif absorbé sur lesdites particules. La libération du principe actif s'opère par désorption.
- (f) La publication "*CHEMISTRY LETTERS* 1995, 707, AKIYOSHI et al" concerne la stabilisation d'insuline par complexation supramoléculaire avec des nanoparticules formées d'une dizaine de chaînes de polysaccharide rendues hydrophobes par greffage de cholestérol.
- (g) L'article paru dans "*MACROMOLECULES* 1997, 30, 4013-4017" décrit des copolymères composés d'un bloc peptidique à base de L-phénylalanine, de  $\gamma$ -benzyl-L-glutamate ou de O-(tétra-O-acétyle- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-L-sérine, et un bloc synthétique, tels que la poly(2-méthyle-2-oxazoline) ou la poly(2-phényle-2-oxazoline). Certains des ces polymères s'agrègent en milieu aqueux pour former des particules de 400 nm, capables de s'associer avec une enzyme, la lipase.
- (h) Le brevet FR 95-03978 a pour objet des particules de polyaminoacides, utiles pour la vectorisation de principes actifs et caractérisées en ce que leurs polyaminoacides constitutifs comprennent au moins deux types d'aminoacides récurrents AAN (neutres, hydrophobes) et AAI (ionisables et hydrophiles). Les

particules sont obtenues spontanément par dispersion de la poudre de polyaminoacide dans une solution aqueuse. Les particules ainsi obtenues s'associent spontanément en suspension aqueuse avec des principes actifs, par exemple de nature protéique.

5 Ces propositions techniques antérieures satisfont peu ou prou aux spécifications du cahier des charges indiqué supra. Néanmoins, de telles particules de vectorisation de principes actifs restent perfectibles.

Dans cet état de fait, l'un des objectifs essentiels de la présente invention est de perfectionner la proposition technique antérieure référencée (h) FR 95-03 978,  
10 en fournissant de nouvelles PV à base de poly- $\alpha$ -aminoacides (PAA) linéaires, amphiphiles et dont les caractères hydrophile et hydrophobe sont, respectivement, apportés par les acides aminés de la chaîne principale du polymère et par des radicaux hydrophobes attachés latéralement à une fraction des aminoacides par une liaison covalente. Ce perfectionnement concerne plus précisément un moyen de maîtriser les  
15 caractéristiques de l'association entre PA et PV afin d'améliorer le taux de chargement en PA, et/ou d'améliorer la cinétique de libération du PA.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension colloïdale aqueuse de particules de vectorisation de principes actifs, qui comprenne des particules de PAA satisfaisant aux spécifications visées ci-dessus et qui constitue  
20 une forme galénique appropriée et convenable pour une administration, par exemple orale, à l'homme ou l'animal.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer un procédé de préparation de particules de PAA utiles, notamment, comme vecteurs de principes actifs, ledit procédé se devant d'être encore plus économique, plus simple à mettre en  
25 oeuvre, non dénaturant pour les principes actifs et devant en outre toujours permettre une maîtrise fine de la granulométrie moyenne des particules obtenues.

Un autre objectif essentiel de l'invention est l'utilisation des susdites suspensions et particules pour la préparation de médicaments (e. g. vaccins) et/ou de nutriments, en particulier pour administration notamment orale, nasale, vaginale,  
30 oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale, de principes actifs, tels que des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides et des polynucléotides.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir des  
35 suspensions de PV, en partie submicroniques et microniques, à base de PAA et susceptibles de servir de vecteurs d'un PA, en particulier médicamenteux et/ou nutritionnel pour l'administration dudit PA à un organisme humain ou animal.

Un autre objectif de la présente invention est de fournir un médicament, du type système à libération prolongée de principes actifs, qui soit aisé et économique à produire et qui soit, en outre, biocompatible et apte à assurer un très haut niveau de biodisponibilité du PA.

- 5           Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir un système de vectorisation de vaccin, qui soit non immunogène intrinsèquement et en combinaison avec un ou plusieurs antigènes.

Les objectifs relatifs aux produits, parmi d'autres, sont atteints par la présente invention qui concerne, tout d'abord, des particules susceptibles d'être  
10 utilisées, notamment pour la vectorisation (PV) de principe(s) actif(s), du type de celles :

- à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements  $\alpha$ -peptidiques ;
- aptes à se former spontanément par mise en contact des PAA avec un milieu  
15 liquide, de préférence avec de l'eau, dans lequel la partie hydrophile des PAA se solubilise plus que la partie hydrophobe desdits PAA, de manière que ces derniers précipitent en s'organisant en arrangements supra-moléculaires discrets ;
- de taille moyenne inférieure à 200  $\mu\text{m}$ , de préférence à 100  $\mu\text{m}$  et, plus préférentiellement encore, comprise entre 0,01 et 20  $\mu\text{m}$  ;
- 20 - et aptes à s'associer avec au moins un PA et à relarguer celui-ci in vivo, de manière prolongée et contrôlée ;

caractérisées :

- en ce que les aminoacides récurrents (AAr) constitutifs de la chaîne principale des PAA sont identiques ou différents entre eux et sont  
25 choisis parmi les aminoacides de type acide et de préférence dans le groupe comprenant l'acide glutamique et/ou l'acide aspartique et/ou leurs sels, respectivement les glutamates et les aspartates,
- et en ce que certains de ces AAr sont porteurs chacun d'au moins un groupement  $R^0$  hydrophobe, ces groupements hydrophobes  $R^0$  étant  
30 identiques ou différents entre eux.

L'une des conditions, pour que les particules selon l'invention se forment, est que la partie hydrophile des PAA se solubilise plus dans le milieu liquide de suspension que leur partie hydrophobe.

Les aminoacides récurrents (AAr) sélectionnés conformément à  
35 l'invention, sont les aminoacides à fonctions carboxyliques (Glu et Asp) sous forme  $\text{COOH}$  ou sous forme de sels (carboxylates)  $\text{COO}^-$ ,  $\text{X}^+$  ; avec X correspondant aux métaux alcalins, de préférence à Na.

Il est du mérite de la demanderesse d'avoir choisi, à titre de matériau constitutif des PV, une classe particulière de poly- $\alpha$ -aminoacides dont les (co)monomères sont des aminoacides récurrents (AAR) de nature polaire et qui ont été rendus amphiphiles en modifiant le caractère hydrophile par l'apport des chaînes latérales hydrophobes sur une fractions des AAR. Cette amphiphilie acquise confère

aux PAA la possibilité de former des suspensions colloïdales de PV, compatible avec le pH des milieux physiologiques rencontrés dans les applications visées. Cette sélection permet, avantageusement, de disposer d'un plus grand choix quant à la nature des groupements hydrophobes, et ainsi d'un meilleur moyen de contrôle de l'hydrophobie du polymère et du PV, ce qui permet d'optimiser l'association et la libération des PA.

La structure du polymère PAA, la nature des acides aminés Asp et Glu et les radicaux hydrophobes sont choisis de telle façon que les chaînes de polymères se structurent spontanément sous forme de particules de petite taille, stables en milieu physiologique.

La structure du polymère PAA, la nature des acides aminés Asp et Glu et les radicaux hydrophobes sont choisis de telle façon que les PV encapsulent des protéines, ou autres PA, en milieu aqueux par un mécanisme spontané et non dénaturant pour les protéines.

La structure du polymère PAA, la nature des acides aminés Asp et Glu et les radicaux hydrophobes sont choisis de telle façon que les PV libèrent les PA en milieu physiologique et, plus précisément, in vivo, la cinétique de libération étant une fonction de la nature du polymère et des PV qu'il est susceptible de former.

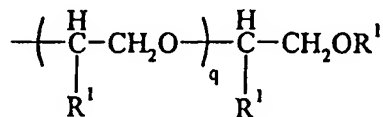
Sans que cela ne soit limitatif, cette sélection vise, plus spécifiquement, des PAA dont la chaîne principale se compose d'AAR identiques entre eux. La structure primaire des PAA peut être du type ordonné, séquentiel alterné (PAA blocs) ou du type désordonné, séquentiel aléatoire (PAA statistique). Selon une caractéristique préférée de l'invention, les PAA sont des polymères contenant jusqu'à environ 1 000 AAR et, de préférence, jusqu'à environ 500 AAR et, plus préférentiellement encore, jusqu'à environ 200 AAR.

Les groupements hydrophobes  $R^0$  participent à l'agréation des chaînes polymères, qui est au coeur de la formation des PV. Suivant une disposition préférée de l'invention, ces groupements  $R^0$  sont identiques ou différents entre eux et sont sélectionnés dans le groupe comprenant :

- (i) les alkyles, les acyles ou les alcényles linéaires ou ramifiés, de préférence linéaires en  $C_1$ - $C_{20}$  et, plus préférentiellement encore, en  $C_2$ - $C_{18}$  ;



- (ii) les groupements hydrocarbonés contenant un ou plusieurs hétéroatomes, de préférence ceux contenant de l'oxygène et/ou du soufre et, plus préférentiellement encore, ceux de formule suivante :



5

dans laquelle :

- les radicaux  $\text{R}^1$  sont identiques ou différents entre eux et correspondent à l'hydrogène ou à un radical répondant à la même définition que celle donnée supra au point (i),
  - $q = 1$  à  $100$  ;
- (iii) les aryles, les aralkyles ou les alkylaryles, de préférence les aryles ;
- (iv) les dérivés naturels hydrophobes, de préférence le cholestérol, les phosphatidylcholines et les diacylglycérols.

10

- 15 Par "groupements hydrocarbonés", on entend au sens de la présente invention, des groupements comprenant notamment des atomes d'hydrogène et de carbone.

De préférence, les groupements  $\text{R}^0$  sont sélectionnés dans le groupe de radicaux suivants : méthyle, éthyle, propyle, docédyle, hexadécyle, octadécyle.

- 20 Conformément à l'invention, chaque groupement hydrophobe  $\text{R}^0$  est attaché à la chaîne principale par une liaison covalente clivable, de préférence par hydrolyse chimique et/ou enzymatique, ladite liaison étant plus spécialement de type ester ou amide.

- 25 Avantageusement, la fraction de monomères AAr porteurs de groupements hydrophobes représente une proportion supérieure ou égale à 3%, de préférence comprise entre 3-70 % et, plus préférentiellement encore, entre 13 et 60 %.

En pratique, les PAA constitutifs des PV de la suspension selon l'invention sont, par exemple:

- \* des polymères à base de glutamate :
  - 30 - poly(glutamate de sodium)-bloc-(glutamate de méthyle),
  - poly(glutamate de sodium)-bloc-(glutamate d'éthyle),
  - poly(glutamate de sodium)-bloc-(glutamate de propyle),
  - poly(glutamate de sodium)-bloc-(glutamate de octadécyl),
  - poly(glutamate de sodium)-bloc-(glutamate de benzyle),
  - 35 - poly(glutamate de sodium)-co-(glutamate de méthyle),

- poly(glutamate de sodium)-co-(glutamate d'éthyle),
- poly(glutamate de sodium)-co-(glutamate de propyle),
- poly(glutamate de sodium)-co-(glutamate de dodécyle),
- poly(glutamate de sodium)-bloc-(glutamate de octadécyle),
- 5 \* des polymères à base d'aspartate :
  - poly(aspartate de sodium)-bloc-(aspartate de méthyle),
  - poly(aspartate de sodium)-bloc-(aspartate d'éthyle),
  - poly(aspartate de sodium)-bloc-(aspartate de propyle),
  - poly(aspartate de sodium)-bloc-(aspartate d'octadécyle),
  - 10 - poly(aspartate de sodium)-bloc-(aspartate de benzyle).

Avantageusement, les particules PV de taille moyenne comprise entre 0,01  $\mu\text{m}$  et 0,5  $\mu\text{m}$ , de préférence entre 0,01 et 0,2  $\mu\text{m}$ . Au sens de l'invention, on entend, par taille ou granulométrie moyenne, la moyenne arithmétique des diamètres en volume [D4,3] établis par diffraction laser et le diamètre de giration mesuré par diffusion élastique de la lumière.

L'un des atouts de l'invention est d'être parvenu à un très bon contrôle de la granulométrie moyenne des ces entités matricielles et de leur répartition granulométrique. Ce contrôle passe par l'atteinte de tailles de particules extrêmement réduites, de l'ordre de quelques nanomètres et de très faible polydispersité, sachant qu'il est possible d'augmenter la taille de ces nanoparticules par agrégation.

Le contrôle de la taille PV s'opère par l'intermédiaire de la composition en AAr et R<sup>0</sup> des polyaminoacides mais aussi, pour une même composition, par le choix d'une structure bloc et du procédé d'obtention.

Selon une alternative quant à la taille des PV de la suspension selon l'invention, lesdites particules de vectorisation PV sont agrégées afin d'obtenir de nouvelles particules de taille supérieure.

Le matériau PAA constitutif des PV selon l'invention est, de préférence, un homopolymère ou un copolymère dont l'AAr = Asp et/ou Glu et qui a été rendu amphiphile en modifiant le caractère hydrophile de cet AAr par apport de chaînes latérales hydrophobes R<sup>0</sup> sur une fraction des AAr. Cette amphiphilie acquise permet de réunir au moins trois propriétés nouvelles et surprenantes :

1. la première est la possibilité de former spontanément des suspensions colloïdales de PV compatibles avec le pH des milieux physiologiques rencontrés dans les applications thérapeutiques visées ;
- 35 2. la deuxième est l'association spontanée des PV avec des PA en l'absence d'autre agent que l'eau qui leur sert de solvant, qui, dans le cas des protéines, n'est pas dénaturant ;

3. la troisième est la possibilité de libérer le PA du complexe d'association PA-PV, dans les conditions physiologiques, avec des profils pharmacocinétique et pharmacodynamique, qui permettent d'envisager des utilisations dans le domaine thérapeutique.

5 Les PA, en particulier de nature protéique, sont, en fait, piégés par les particules de vectorisation PV qui peuvent être assimilées à des matrices formées d'eau et de PAA au sein desquelles se sont dispersés le ou les PA. Leur libération s'opère, soit par dissociation spontanée, soit au fur et à mesure de la dégradation des PAA et de la déstructuration subséquente des particules. Le piégeage des PA est  
10 réalisé spontanément par simple mélange de ceux-ci dans une suspension aqueuse colloïdale de PV selon l'invention.

Les particules PV chargées par au moins un principe actif PA constituent un autre objet de la présente invention.

Selon un autre de ses aspects, en amont des particules, qui forment son  
15 objet essentiel, l'invention concerne, en outre, les précurseurs des PV qui sont les PAA sélectionnés, tels que définis supra.

En aval des PV, l'invention englobe également la suspension colloïdale, de préférence aqueuse, de particules telles que définies supra.

Cette suspension colloïdale de PV chargées en PA peut être utilisée pour  
20 la vectorisation et le relargage prolongé et contrôlé dudit PA in vivo, à des fins thérapeutiques.

L'invention a trait, par ailleurs, à un procédé de préparation de la susdite suspension colloïdale de particules e. g. de vectorisation (PV) de principes actifs (PA),

25 caractérisé en ce qu'il consiste, essentiellement :

- I - à mettre en oeuvre des PAA linéaires et à enchaînements  $\alpha$ -peptidiques d'acides aminés récurrents (AAR) sélectionnés parmi les acides aminés naturels polaires que sont l'acide glutamique et l'acide aspartique, et/ou parmi leurs sels, respectivement les  
30 glutamates et les aspartates ; certains de ces AAR étant porteurs chacun d'au moins un groupement hydrophobe  $R^0$ , ces groupements  $R^0$  étant identiques ou différents entre eux ;
- II - à placer les PAA amphiphiles dans un milieu solvant, de préférence aqueux;
- 35 III - puis à rendre insolubles au moins les AAR porteurs de  $R^0$  dans le milieu, de manière à faire précipiter ces AAR et à former ainsi des arrangements supra moléculaires discrets.

Selon une variante avantageuse de ce procédé, on incorpore au moins un principe actif dans le milieu liquide contenant les particules PV, de manière à obtenir une suspension colloïdale de PV chargées en principe(s) actif(s).

5 De plus, pour augmenter la taille des particules, il est envisageable de prévoir, dans ce procédé de préparation de la suspension, au moins une étape supplémentaire d'agrégation des particules, à l'aide d'au moins un agent d'agrégation constitué, par un sel et/ou un acide et/ou une base et/ou un polymère éventuellement ionique (e. g. polylysine, polyéthylène imine, etc.). Pour plus de détails, on se référera à la demande de brevet FR 95-03 918.

10 Après avoir passé en revue les caractéristiques essentielles de l'invention en termes de particules de précurseurs PAA desdites particules de suspension colloïdale de ces particules de préparation de cette suspension, il convient, à présent, de développer un peu plus, d'une part, l'aspect obtention des PAA et des particules chargées ou non en PA et, d'autre part, l'aspect application des PV et des suspensions  
15 de ces PV dans des systèmes médicamenteux à libération prolongée et contrôlée de PA.

Les PAA sont obtenus de manière connue en soi. A cet égard, on se reportera, par exemple, à : *"Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, volume 12, p. 786 ; John Wiley & Sons"*. Dans le cadre de l'invention, on préfère  
20 recourir aux techniques de polymérisation faisant intervenir des anhydrides de N-carboxy- $\alpha$ -aminoacides dont la préparation est donnée, e. g. dans : *"Biopolymers, 15, 1869 (1976)"*. S'agissant des techniques de polymérisation de ces monomères N-carboxy- $\alpha$ -aminoacides (NCA), elles sont détaillées dans l'ouvrage de H. R. KRICHELDORF *" $\alpha$ -Aminoacid-N-Carboxy Anhydride and Related Heterocycles"*  
25 *Springer Verlag (1987)*.

La nature de la distribution des groupement hydrophobes sur les chaînes de polymères est statistique ou ordonnée, selon la voie de synthèse choisie. A cet égard, il existe une multitude de schémas réactionnels conduisant aux PAA sélectionnés comme matière première pour l'obtention des PV selon l'invention. Les  
30 trois schémas réactionnels sont donnés ci-après, à titre non limitatif :

(i) synthèse ou mise en oeuvre (étape A) d'un copolymère PAA comportant au moins deux types de groupements récurrents hydrophobes  $R^{01}$  et  $R^{02}$ , puis, par élimination sélective (étape B), au moins un d'entre eux est éliminé pour régénérer AAr dans son état non modifié (par exemple  $R^{01}$  = méthyle;  
35  $R^{02}$  = benzyle ; l'étape B est une étape de débénylation par hydrogénation, par addition du HBr, etc) ;

- (ii) Synthèse ou mise en oeuvre (étape A) d'un homopolymère PAA hydrophobe comportant (exclusivement) des aminoacides récurrents hydrophobes ( $\text{AAr-R}^0$ ) qui sont tous porteurs d'un même groupement hydrophobe  $\text{R}^0$  (e. g. méthyle, éthyle, propyle, benzyle, stéaryle),  
5 puis l'élimination partielle (étape B) d'une partie des groupements  $\text{R}^0$  (e.g. de par hydrolyse ou saponification du PAA polyglutamate de méthyl) ;
- (iii) synthèse ou mise en oeuvre (étape A) d'un homopolymère PAA hydrophile comportant (exclusivement) des aminoacides récurrents hydrophiles AAr, puis hydrophobisation partielle (étape B) par la formation d'une liaison  
10 covalente avec un ou plusieurs groupements  $\text{R}^0$  (e.g. par estérification à l'aide d'alcools gras ou par déplacement ionique à l'aide d'un halogénure d'alkyl).

Dans ces trois variantes (i), (ii), (iii), la rotule de greffage des groupements hydrophobes  $\text{R}^0$  sur la chaîne latérale pendante des AAr, est avantageusement une fonction ester ou amide.

- 15 En pratique, les copolymères PAA hydrophobes mis en oeuvre dans la variante (i) sont, par exemple, des copolymères d'acide glutamique et/ou d'acide aspartique dont les fonctions carboxyliques latérales pendantes sont protégées par estérification selon des techniques connues de l'homme de l'art. Il peut s'agir, e. g., de copoly(stérylglutamate-benzylglutamate) obtenu par polymérisation des N-  
20 carboxyanhydrides des  $\text{AAr}_{01}$  (Glu-O-stéaryl) et  $\text{AAr}_{02}$  (Glu-O-benzyl).

- L'hydrophilisation partielle du co-PAA résulte de l'élimination sélective de l'un des groupements  $\text{R}^0$ , par hydrolyse et/ou saponification. Cela équivaut à une déprotection qui, dans l'exemple ci-dessus, est une débenzylation sélective. On exploite ici les différences de sensibilité au clivage des différents esters formant les  
25 groupements hydrophobes  $\text{R}^{01}$  et  $\text{R}^{02}$ . A titre d'exemples de procédés de déprotection connus, on peut citer ceux par saponification des esters méthyliques (STAHMAN et coll. ; J. Biol. Chem., 197, 771 (1952) ; KYOWA HAKKO, FR 2 152 582) ou par débenzylation [BLOUT et coll. ; J. Amer. Chem. Soc., 80, 4631 (1958)].

- Concernant la variante (ii), l'homopolymère PAA hydrophobe est, par  
30 exemple, du polystérylglutamate obtenu par polymérisation de NCA de Glu-O-stéaryl. L'hydrolyse partielle de cet homopolymère hydrophobe selon les méthodes de déprotection connues sus-visées conduit à un poly(glutamate)-co-(stérylglutamate).

- Dans la variante (iii), l'homopolymère PAA hydrophile peut être, e. g., l'acide polyglutamique ou un polyglutamate, synthétisé par polymérisation de NCA  
35 d'acide glutamique. L'hydrophobisation de ce type de PAA poly Glu s'effectue, par exemple, par réaction avec du iodure de stéaryle en milieu basique. Cela conduit à du

poly(glutamate)-co-(stéarylglutamate). Ce genre de techniques est notamment décrit dans [Polymer Bulletin, 32, 127 (1994)].

La formation des PV en milieu liquide, sous forme de suspension colloïdale conforme à l'invention, peut être réalisée pendant ou après la synthèse des PAA amphiphiles définis ci-dessus.

Selon une préférence de l'invention, la formation de particules s'opère par l'addition d'eau ou de sel à une solution de PAA, porteur de groupements  $R^0$ , dissous dans un solvant. Cette opération consiste, préférentiellement, à diminuer la solubilité de la fraction hydrophobe pour qu'elle précipite et, ce faisant, entraîne la formation des particules. L'homme de l'art est en mesure de trouver d'autres moyens simples pour diminuer la solubilité de la partie hydrophobe du polymère, en modifiant, par exemple, la température, le solvant(s), ou en combinant des techniques différentes.

La préparation de la suspension colloïdale de PV est, avantageusement, suivie d'une étape de purification, impliquant les techniques connues à l'homme du métier, telles que la distillation, la filtration, la modification du pH, la chromatographie et/ou la dialyse. De telles méthodes permettent d'éliminer les sels ou les solvants indésirables. Après cette étape facultative de purification, on dispose d'une suspension colloïdale de PV que l'on peut utiliser directement, ou qu'il est envisageable d'isoler ou de recueillir, dans le cadre d'une étape IV, par tout moyen physique connu en soi et approprié, comme par exemple par filtration, par ultrafiltration, par séparation par gradient de densité, par centrifugation, par précipitation, éventuellement par ajout de sel, ou bien encore par lyophilisation.

Suivant une variante de l'invention, le procédé de préparation de la suspension colloïdale est caractérisé en ce que l'on incorpore au moins un principe actif dans le milieu liquide contenant les particules PV, de manière à obtenir une suspension colloïdale de PV chargées en ou associées avec un ou plusieurs principe(s) actif(s) PA.

Cette incorporation, qui conduit à un piégeage de PA par les PV, peut être réalisée de la manière suivante :

- mise en solution aqueuse de PA, puis ajout des PV, soit sous forme de suspension colloïdale, soit sous forme de PV isolées (lyophilisat ou précipitat) ;
- ou ajout de PA, soit en solution, soit à l'état pur ou préformulé, à une suspension colloïdale de particules PV, éventuellement préparée extemporanément par la dispersion de PV sèches dans un solvant approprié, tel que l'eau.

Le principe actif, susceptible d'être associé aux particules selon l'invention, peut être médicamenteux et/ou nutritionnel. Il est, de préférence, choisi parmi :

- les protéines et/ou les peptides parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, le facteur IX, les interleukines ou leurs mélanges,
- les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée,
- les acides nucléiques et, préférentiellement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN,
- les vitamines, les acides aminés et les oligo-éléments.
- et leurs mélanges.

La présente invention vise, également, les précurseurs de ces particules PV constitués par les PAA particuliers définis ci-dessus et caractérisés en ce qu'ils contiennent des PA médicamenteux du genre de ceux énumérés ci-dessus en particulier l'insuline et/ou des PA formés par au moins un vaccin ou des PA nutritionnels, phytosanitaires ou cosmétiques.

La présente invention concerne également les suspensions colloïdales de PV caractérisées en ce qu'elles contiennent les mêmes PA que ceux énoncés ci-dessus, notamment pour les précurseurs de PV.

La présente invention concerne, enfin, les médicaments ou les spécialités pharmaceutiques ou nutritionnelles comprenant les PV chargées en PA et définies ci-dessus.

Selon un autre de ses aspects, l'invention vise également l'utilisation de ces PV chargées en PA, pour la fabrication de médicaments du type systèmes à libération contrôlée de PA.

Dans le cas de médicaments, il peut s'agir, par exemple, de ceux administrables, de préférence par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale.

Les applications cosmétiques envisageables sont, par exemple, les compositions applicables par voies transdermiques.

Les produits phytosanitaires concernés peuvent être, par exemple, des herbicides, des pesticides, des insecticides, des fongicides, etc..

La présente invention a également pour objet les compositions phytosanitaires et cosmétiques comprenant des PV chargées en PA du type de ceux visés supra.

Les exemples qui suivent permettront de mieux comprendre l'invention dans ses différents aspects produit/procédé/application. Ces exemples illustrent la

préparation de particules de polyaminoacides chargés ou non en principes actifs, de même qu'ils présentent les caractéristiques de structure et les propriétés de ces particules.

5

## EXEMPLES

### EXEMPLE 1 - PREPARATION DU POLYMERE - POLY(GLUTAMATE DE SODIUM)-BLOC-(GLUTAMATE DE METHYLE).

10 Les techniques utilisées, pour la polymérisation des NCA en polymères de structures en blocs ou statistiques sont connues de l'homme de l'art et sont détaillées dans l'ouvrage de H. R. KRICHELDORF " $\alpha$ -aminoacides-N-Carboxy Anhydrides and Related Heterocycles", Springer Verlag (1987). La synthèse suivante précise la synthèse de l'un d'entre eux.

15

*Synthèse de la poly(GluOMe)<sub>63</sub>-poly(GluOBz)<sub>63</sub>* : 10 g de NCA-GluOMe sont solubilisés dans un mélange de 150 ml de dioxane et 450 ml de toluène à 60 °C. 5 ml d'une solution de 0,91 g de benzylamine dans 50 ml de dioxane sont ajoutés au monomère en une fois. Après 1 h, on ajoute 14,1 g de NCA-GluOBz solubilisé  
20 préalablement dans un mélange de 20 ml dioxane et 60 ml de toluène. La polymérisation continue encore durant 19-24 h. Le polymère est précipité du milieu réactionnel dans 2 litres de méthanol, auxquels on ajoute encore 500 ml d'eau. Le solide obtenu est filtré, séché à l'étuve à 50 °C sous vide.

Rendement 90 %. Composition par RMN 1 h (TFA-d) 45 % molaire GluOBz.

25 Viscosité réduite (0,5 % de TFA à 25 °C) 0,3 dl/g. Masse Molaire par GPC : 20 000 g/mol.

10 g de polymère sont ensuite mis à réagir à 0 °C dans 200 ml TFA avec 6 ml d'acide trifluorométhanesulfonique pendant 15 min. Lors de l'hydrolyse des groupements benzyliques, le polymère précipite sous forme de particules colloïdales. Après  
30 évaporation à sec, les particules sont reprises dans de l'eau et neutralisées à pH 7,4 avec de la soude. Une étape de dialyse assure l'élimination des sels du trifluoroacétate. Les particules sont enfin isolées par lyophilisation.

Rendement quantitatif. Analyse élémentaire [Na] 8,2 % (composition calculée 53 % GluONa).

35



**EXEMPLE 2 - PREPARATION DU POLYMERE POLY(GLUTAMATE DE SODIUM)-BLOC-(GLUTAMATE DE D'ETHYLE).**

5 Ce polymère est préparé selon la méthode décrite dans l'exemple 1, utilisant les NCA du glutamate d'éthyle et du benzyle dans un rapport molaire 1:3. Après les étapes de polymérisation et de débenzylation, le polymère est purifié par dialyse à pH 7 et ensuite il est lyophilisé afin d'obtenir une poudre blanche.

10 **EXEMPLE 3 - PREPARATION DU POLYMERE POLY(GLUTAMATE DE SODIUM)-BLOC-(GLUTAMATE DE HEXADECYLE).**

15 Ce polymère est préparé selon la méthode décrite dans l'exemple 1, utilisant les NCA du glutamate de dodécyle et du benzyle dans un rapport molaire 1:3. Après les étapes de polymérisation et de débenzylation, le polymère est purifié par dialyse à pH 7 et ensuite il est lyophilisé afin d'obtenir une poudre blanche.

**EXEMPLE 4 - PREPARATION DU POLYMERE POLY(GLUTAMATE DE SODIUM)-CO-(GLUTAMATE DE DODECYLE).**

20 10 g d'acide polyglutamique (degré de polymérisation 120) sont dissous dans 200 ml de diméthylsulfoxyde. On ajoute ensuite 15,5 g de  $\text{KHCO}_3$  puis 2,87 ml de iodododécane. Le milieu réactionnel est maintenu à 60 °C pendant 40 heures sous flux d'azote. Le polymère est isolé par précipitation dans 1,5 l d'acide chlorhydrique 0,1 N, et le précipité ainsi formé lavé plusieurs fois dans de l'eau. La suspension  
25 colloïdale recherchée est obtenue en ajustant le pH du milieu à 7,4 par de la soude, puis déshydratée par lyophilisation. Le polymère lyophilisé est enfin lavé plusieurs fois dans de l'acétate d'éthyle, et séché sous vide à 50 °C. Composition par RMN (TFA-d): 12% des acides glutamiques estérifiés par le dodécyle. Eau Résiduelle après lyophilisation 10.5%. Analyse élémentaire % (calc.): C 41,29 (42,15); H 5,99  
30 (6,01); N 7,45 (7,63); Na 10,44 (10,45).

**EXEMPLE 5 - MISE EN EVIDENCE DES NANOPARTICULES PAR DIFFUSION DE LA LUMIERE (DDL) ET PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET).**

35

10 mg de particules du polymère 1 sont suspendus dans 10 ml d'eau ou une solution aqueuse de sel. Cette solution est ensuite introduite dans un granulomètre Coulter (ou

diffractomètre laser). Les résultats de l'analyse de la granulométrie des différents produits testés sont présentés dans le tableau 1 suivant.

Tableau 1 - Mesures de la taille des PV

5

EXEMPLE	POLYMERE	TAILLE (nm)
Témoin	POLY[(GLU-O-NA) <sub>1,0</sub> ] <sub>x</sub>	PAS DE PARTICULES (produit soluble)
1	POLY[(GLU-O-NA) <sub>0,63</sub> -BLOC-(GLU-O-METHYL) <sub>0,37</sub> ] <sub>x</sub>	100
2	POLY[(GLU-O-NA) <sub>0,66</sub> -BLOC-(GLU-O-ETHYL) <sub>0,34</sub> ] <sub>x</sub>	90
3	POLY[(GLU-O-NA) <sub>0,65</sub> -BLOC-(GLU-O- HEXADECYLE) <sub>0,35</sub> ] <sub>x</sub>	110
4	POLY[(GLU-O-NA) <sub>0,88</sub> -CO-(GLU-O-DODECYL) <sub>0,12</sub> ] <sub>x</sub>	15

**EXEMPLE 6 - TEST D'ASSOCIATION DES NANOPARTICULES AVEC UNE PROTEINE (L'INSULINE).**

10 A partir d'une solution tampon phosphate isotonique de pH 7,4, on prépare une solution d'insuline humaine titrée à 1,4 mg/ml correspondant à 40 UI/ml. Dans 1 ml de cette solution d'insuline, on disperse 10 mg du PV préparé dans l'exemple 1. Après 15 heures d'incubation à température ambiante, l'insuline associée aux PV et l'insuline libre sont séparées par centrifugation (60 000 g, 1 heure) et ultrafiltration (seuil de

15 filtration 300 000 D). L'insuline libre récupérée dans le filtrat est dosée par CLHP ou par ELISA et l'on en déduit par différence la quantité d'insuline associée. La quantité d'insuline associée au PV est supérieure à 0,77 mg, ce qui représente plus de 55 % du total de l'insuline engagée.

20 Le tableau suivant rassemble les résultats des mesures de taux d'association effectuées sur différents PV. Le taux d'association exprime le pourcentage d'insuline associée par rapport à l'insuline engagée dans une préparation titrée à 1,4mg/ml d'insuline et 10 mg/ml de PV.

Tableau 2 - Mesures du taux d'association avec l'insuline pour un mélange 0,14 mg insuline/mg PV

EXEMPLE	POLYMERE	TAUX D'ASSOCIATION (%)
Témoins	POLY[(GLU-O-NA) <sub>1,0</sub> ] <sub>x</sub>	0
1	POLY[(GLU-O-NA) <sub>0,63</sub> -BLOC-(GLU-O-METHYL) <sub>0,37</sub> ] <sub>x</sub>	55
2	POLY[(GLU-O-NA) <sub>0,66</sub> -BLOC-(GLU-O-ETHYL) <sub>0,34</sub> ] <sub>x</sub>	26
3	POLY[(GLU-O-NA) <sub>0,65</sub> -BLOC-(GLU-O-HEXADECYLE) <sub>0,35</sub> ] <sub>x</sub>	36
4	POLY[(GLU-O-NA) <sub>0,88</sub> -CO-(GLU-O-DEODECYL) <sub>0,12</sub> ] <sub>x</sub>	> 90

- 5 A titre comparatif, l'insuline ne s'associe pas avec le polyglutamate de sodium. Ce teste préliminaire sert à la détermination du mélange optimal en PV et en insuline pour obtenir une formulation optimale en PV et en insuline avec un haut taux de chargement.
- 10 **EXEMPLE 7 - DISSOCIATION ET CARACTERISATION DE LA PROTEINE APRES SA FORMULATION AVEC DES PV (L'INSULINE).**
- Une formulation est préparée à partir de PV et d'insuline, les quantités de chaque étant déterminées d'après les mesures de taux d'association dans l'exemple 6.
- 15 A partir d'une solution tampon phosphate isotonique de pH 7,4, on prépare une solution d'insuline humaine titrée à 2,8 mg/ml correspondant à 80 UI/ml. Dans 1 ml de cette solution d'insuline, on disperse 56 mg du PV préparé dans l'exemple 1. Le pH et l'isotonicité sont ajustés, si nécessaire, afin d'obtenir une formulation à pH 7,4 et 280-300 mOs.
- 20 Cette préparation est diluée dans des volumes croissants d'une solution à 0,5 % d'albumine bovine, isotonique et tamponnée à pH 7,4 par un tampon phosphate 0,01 M. La fraction d'insuline libérée est dosée par CLHP ou ELISA. Voir figure ci-jointe. La fraction libérée augmente avec la dilution. La totalité de l'insuline est libérée à partir de la dilution 20. Les dosages par CLHP et ELISA montrent que >90% de
- 25 l'insuline est associée dans cette formulation.

**EXEMPLE 8 - TEST IN-VIVO AVEC DES PV-CHARGES D'UNE PROTEINE  
THERAPEUTIQUE (L'INSULINE).**

- 5 Une formulation est préparée à partir de PV et d'insuline, les quantités de chaque étant déterminées d'après les mesures de taux d'association dans l'exemple 7.
- Un groupe de 4 chiens beagle (mâles et femelles) pesant entre 10 et 12 kg sont mis à jeûn 18 heures. Une préparation est formulée selon l'exemple 8 et se compose de 80 UI d'insuline et 56 mg de PV (préparés selon l'exemple 1) dans 1 ml de tampon
- 10 PBS. Les chiens reçoivent ensuite une administration sous-cutanée de cette préparation d'insuline à raison de 1 UI/kg de poids. Le sang est prélevé pour un dosage du glucose et d'insuline avant (-2 h, -1 h et 0 h) et après (1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h, 28 h, 32 h, 36 h, 40 h, 44 h, 48 h) l'injection. Les concentrations en glucose sont mesurées dans les prélèvements par la méthode
- 15 glucose-oxydase et l'insuline sérique est dosée en utilisant une méthode radio-immunologique.
- La fig. 1 annexée trace la moyenne de l'évolution, en fonction du temps T en heures (h), du glucose et de l'insuline sérique pour les PV préparées selon l'exemple 1. La courbe —●— est celle de l'insulinémie exprimée en milli-unités internationales.
- 20 La courbe ---○--- est celle de la glycémie exprimée en mmol/l.
- Le tableau 3 ci-après rassemble les résultats de la durée d'action d'insuline en présence des différents PV selon les exemples 1 à 5.

25

30

35

Tableau 3 - Mesures du temps d'action de l'insuline (effet hypoglycémiant) en présence de PV selon l'invention

EXEMPLE	POLYMERE	TEMPS DE RETOUR AU NIVEAU BASAL (h)
	INSULINE SOLUBLE (SANS PV)	1
	POLY[(GLU-O-NA) <sub>1,0</sub> ] <sub>x</sub>	1
1	POLY[(GLU-O-NA) <sub>0,63</sub> -BLOC-(GLU-O-METHYL) <sub>0,37</sub> ] <sub>x</sub>	12
2	POLY[(GLU-O-NA) <sub>0,66</sub> -BLOC-(GLU-O-ETHYL) <sub>0,34</sub> ] <sub>x</sub>	15
3	POLY[(GLU-O-NA) <sub>0,65</sub> -BLOC-(GLU-O-HEXADECYLE) <sub>0,35</sub> ] <sub>x</sub>	20
4	POLY[(GLU-O-NA) <sub>0,88</sub> -CO-(GLU-O-DODECYL) <sub>0,12</sub> ] <sub>x</sub>	12

5 Cet exemple démontre la non dénaturation de l'insuline en présence de PV selon l'invention.

De plus, cet exemple 8 permet de mettre en évidence l'augmentation de la durée d'action de l'insuline, et donc, l'utilité des PV en tant que système retard pour la libération contrôlée de l'insuline. Elle montre également comment il est possible de  
10 maîtriser la durée d'action par la choix judicieuse du groupement hydrophobe.

## REVENDEICATIONS :

1 - Particules susceptibles d'être utilisées, notamment, pour la vectorisation (PV) de principes actifs (PA) du type de celles :

- à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements  $\alpha$ -peptidiques ;
- aptes à se former spontanément par mise en contact des PAA avec un milieu liquide, de préférence avec de l'eau, dans lequel la partie hydrophile des PAA se solubilise plus que la partie hydrophobe desdits PAA, de manière que ces derniers précipitent en s'organisant en arrangements supra-moléculaires discrets ;
- de taille moyenne inférieure à 200  $\mu\text{m}$ , de préférence à 100  $\mu\text{m}$  et, plus préférentiellement encore, comprise entre 0,01 et 20  $\mu\text{m}$  ;
- et aptes à s'associer avec au moins un PA et à relarguer celui-ci in vivo, de manière prolongée et contrôlée ;

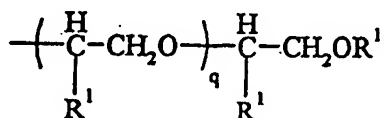
caractérisées :

- en ce que les aminoacides récurrents (AAR) constitutifs de la chaîne principale des PAA sont identiques ou différents entre eux et sont choisis parmi les aminoacides naturels polaires que sont l'acide glutamique et l'acide aspartique et/ou parmi leurs sels, respectivement les glutamates et les aspartates,
- et en ce que certains de ces AAR sont porteurs chacun d'au moins un groupement  $\text{R}^0$  hydrophobe, ces groupements hydrophobes  $\text{R}^0$  étant identiques ou différents entre eux.

2 - Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce que  $\text{R}^0$  est distribué sur les chaînes de polymère de manière statistique ou ordonnée.

3 - Particules selon la revendication 1 ou 2, caractérisées en ce que les groupements  $\text{R}^0$  liés aux AAR sont identiques ou différents entre eux et sont sélectionnés dans le groupe comprenant :

- (i) les alkyles, les acyles ou les alcényles linéaires ou ramifiés, de préférence linéaires en  $\text{C}_1$ - $\text{C}_{20}$  et, plus préférentiellement encore, en  $\text{C}_2$ - $\text{C}_{18}$  ;
- (ii) les groupements hydrocarbonés contenant un ou plusieurs hétéroatomes, de préférence ceux contenant de l'oxygène et/ou du soufre et, plus préférentiellement encore, ceux de formule suivante :



dans laquelle :

- les radicaux  $R^1$  sont identiques ou différents entre eux et correspondent à l'hydrogène ou à un radical répondant à la même définition que celle donnée supra au point (i),

5                   -  $q = 1$  à  $100$  ;

(iii) les ayles, les aralkyles ou les alkylaryles, de préférence les ayles ;

(iv) les dérivés naturels hydrophobes, de préférence le cholestérol, les phosphatidylcholines et les diacylglycérols.

10               4 - Particules selon la revendication 3, caractérisées en ce que les groupements  $R^0$  sont sélectionnés dans le groupe de radicaux suivants : méthyle, éthyle, propyle, hexyle, octyle, dodécyle, hexadécyle ou octadécyle.

5               5 - Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisées en ce que chaque groupement hydrophobe  $R^0$  est relié à la chaîne d'AAR par une liaison covalente clivable, de préférence par hydrolyse chimique et/ou enzymatique, ladite liaison étant plus spécialement de type ester et/ou amide.

15               6 - Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisées en ce que la fraction des AAR<sub>0</sub> hydrophobes représente une proportion supérieure ou égale à 3 %, de préférence comprise entre 3 et 70 % et, plus  
20               préférentiellement encore, entre 3 et 60 %.

7 - Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisées en ce que les PAA sont des polymères contenant, jusqu'à environ 1 000 AAR et, de préférence, jusqu'à environ 500 AAR.

25               8 - Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisées en ce que ce sont des particules de vectorisation PV de taille moyenne comprise entre 0,01 et 0,5  $\mu\text{m}$ , de préférence entre 0,01 et 0,2  $\mu\text{m}$ .

9 - Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisées en ce qu'elles sont agrégées afin d'obtenir de nouvelles particules de taille supérieure.

30               10 - Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un principe actif.

11 - Précurseurs des PV selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisés en ce qu'il sont constitués par les PAA tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 7.

35               12 - Suspension colloïdale, de préférence aqueuse, de particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 10.

13 - Procédé de préparation de la suspension colloïdale selon la revendication 12,

caractérisé en ce qu'il consiste, essentiellement :

- 5 I - à mettre en oeuvre des PAA amphiphiles linéaires et à enchaînements  $\alpha$ -peptidiques d'acides aminés récurrents (AAR) sélectionnés parmi les acides aminés naturels polaires que sont l'acide glutamique et l'acide aspartique et/ou parmi leurs sels, respectivement les glutamates et les aspartates ; certains de ces AAR étant porteurs chacun d'au moins un groupement
- 10 hydrophobe  $R^0$ , ces groupements  $R^0$  étant identiques ou différents entre eux ;
- II - à placer les PAA amphiphiles dans un milieu solvant, de préférence aqueux,
- 15 III - puis à rendre insolubles au moins les AAR porteurs de  $R^0$  dans le milieu, de manière à faire précipiter ces AAR et à former ainsi des arrangements supra moléculaires discrets.

14 - Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'on incorpore au moins un principe actif dans le milieu liquide contenant les particules PV, de manière à obtenir une suspension colloïdale de PV chargées en principe(s) actif(s).

20 15 - Procédé selon la revendication 13 ou 14, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape supplémentaire d'agrégation des particules, à l'aide d'au moins un agent d'agrégation constitué, par un sel et/ou un acide et/ou une base et/ou, un polymère éventuellement ionique.

25 16 - Précurseurs selon la revendication 11, particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou suspension selon la revendication 12, comprenant au moins un principe actif médicamenteux qui est, de préférence, choisi parmi :

- 30 • les protéines et/ou les peptides parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, le facteur IX, les interleukines ou leurs mélanges,
- 35 • les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée,
- les acides nucléiques et, préférentiellement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN,
- et leurs mélanges.



17 - Précurseurs selon la revendication 11, particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou suspension selon la revendication 12 contenant de l'insuline à titre de principe actif.

5 18 - Précurseurs selon la revendication 11, particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou suspension selon la revendication 12 contenant un principe actif constitué par au moins un vaccin.

10 19 - Précurseurs selon la revendication 11, particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 ou suspension selon la revendications 12 contenant au moins un principe actif formé par au moins un produit nutritionnel phytosanitaire ou cosmétique.

20 - Spécialité pharmaceutique, nutritionnelle, phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte des précurseurs selon la revendication 11 et/ou des particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, et/ou une suspension selon la revendication 12.

1/1

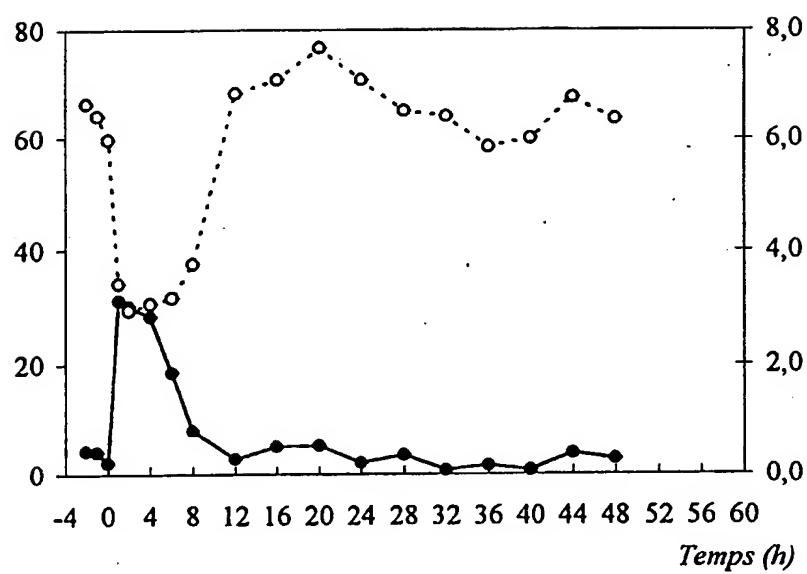


Fig. 1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ternational Application No  
PCT/FR 99/02859

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K9/16 A61K9/51		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 734 720 A (FLAMEL TECH SA) 2 October 1996 (1996-10-02) cited in the application the whole document -----	1-20
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center;">7 February 2000</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center;">14/02/2000</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center;">Marttin, E</div>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/FR 99/02859

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0734720 A	02-10-1996	FR 2732218 A	04-10-1996
		AU 706746 B	24-06-1999
		AU 5337796 A	16-10-1996
		BR 9607863 A	30-06-1998
		CA 2215254 A	03-10-1996
		CN 1183040 A	27-05-1998
		WO 9629991 A	03-10-1996
		JP 11503118 T	23-03-1999
		NZ 305392 A	26-08-1998
		US 5904936 A	18-05-1999
		ZA 9602446 A	07-08-1996

---

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De ... de l'Internationale No

PCT/FR 99/02859

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 A61K9/16 A61K9/51

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 734 720 A (FLAMEL TECH SA) 2 octobre 1996 (1996-10-02) cité dans la demande le document en entier -----	1-20



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 février 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/02/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Marttin, E

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De .de Internationale No

PCT/FR 99/02859

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0734720 A	02-10-1996	FR 2732218 A	04-10-1996
		AU 706746 B	24-06-1999
		AU 5337796 A	16-10-1996
		BR 9607863 A	30-06-1998
		CA 2215254 A	03-10-1996
		CN 1183040 A	27-05-1998
		WO 9629991 A	03-10-1996
		JP 11503118 T	23-03-1999
		NZ 305392 A	26-08-1998
		US 5904936 A	18-05-1999
		ZA 9602446 A	07-08-1996
-----			